

氏名(本籍)	徳川 奉樹 (大阪府)
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 第423号
学位授専の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成14年12月11日
学位論文題目	Modes of Silencing of p16 in Development of Esophageal Squamous Cell Carcinoma (食道扁平上皮癌の発生におけるp16不活化の様式)

審査委員	主査 教授	藤 山 佳 秀
	副査 教授	柏 木 厚 典
	副査 教授	岡 部 英 俊

## 論文内容要旨

### 【目的】

食道扁平上皮癌の発癌、進展におけるp16不活化の様式および関連を明らかにするために各進行度の食道扁平上皮癌42症例につきp16の免疫染色性、9p13-22にある6つのマイクロサテライトの遺伝子座のloss of heterozygosity (LOH) およびp16のプロモーターでのメチル化の状態を調べた。

### 【方法】

46歳から74歳の男性37症例および女性5症例計42症例の食道癌症例を対象とした。それぞれの摘出標本の全割ブロックを作成し、腫瘍各所、dysplasiaおよび周囲正常組織からDNAサンプルをとりp16のメチル化、p16近傍マイクロサテライトマーカーのLOH、および免疫染色を調べマッピングした。免疫染色は、SAB法にて抗cyclinD1抗体、抗p16抗体、および抗pRb抗体を用いて行い核染の比率にて5段階評価を行った。Microdissectionは5 $\mu$ mのパラフィン切片を用いて食道扁平上皮癌の各深達度[粘膜(ml,m2,m3)粘膜下層(sml,sm2,sm3)]、dysplasiaおよび正常粘膜でレーザーキャプチャーを用いて細胞の採取を行い、採取細胞をすぐにプロテナーゼを含む溶液にて42°C48時間インキュベートしDNA抽出を行った。4症例(case1,10,13,14)については摘出標本の全ブロックから抽出しその他の症例では摘出標本の50%以上のブロックを用いて行った。抽出したDNAサンプルのうち2 $\mu$ lをテンプレートとしてLOHおよびHDのマイクロサテライト解析に用いた。用いたマイクロサテライトマーカーは、次の6種類で(IFNa, D9S1747, D9S1751, D9S1748, D9S1752,D9S171) genetic analyzer (ABI PRIZM 310) にて解析した。メチル化の判定にはサンプルDNAにbisulfite modificationを行ったのちMethylation-specific PCRを用いgenetic analyzer (ABI PRIZM 310) にて解析を行い非メチル化・メチル化の判定をした。

### 【結果】

食道扁平上皮癌から十分に離れた正常粘膜ではいずれもp16のメチル化、p16近傍マイクロサテライトマーカーのLOHは認めなかった。38症例(90.5%)の食道扁平上皮癌および34症例(81%)のdysplasiaにp16の免疫染色の発現が認められず、一方で食道扁平上皮癌近傍の組織学的に正常上皮細織でありp16のメチル化を示している組織でもp16の免疫染色については発現を認めた。p16発現のない食道扁平上皮癌/dysplasiaのそれぞれ38/34のうち16/0にp16メチル化およびp16近傍マイクロサテライトマーカーにLOHがみられ、またそれぞれのうち14/30はメチル化のみを認め、8/4はLOHのみを認めた。p16近傍マイクロサテライトマーカーにLOHを認める食道扁平上皮

癌でhomozygous deletion (HD) を認めるかどうかは癌の進行度に関係している。p16のメチル化/p16近傍マイクロサテライトマーカーのLOHが+/+の症例のマッピングで+/+の食道扁平上皮癌は、+/-の食道扁平上皮癌に包含されていた。そして+/-の食道扁平上皮癌は、+/-の正常上皮との両方もしくは一方に周囲が囲まれていて、一方では-/+のdysplasiaには-/+の食道扁平上皮癌が附随していた。

#### 【考 察】

p16のメチル化は進行癌での報告があるが、今回我々の研究では早期食道扁平上皮癌だけでなく前癌病変およびその背景にある正常に見える上皮細胞にも認められた。また30例中24例では、p16のメチル化を認めるがp16の発現もある正常粘膜が、p16のメチル化を認めp16の発現のない癌およびdysplasiaの周りを縁取るように存在していた。一方で癌病変から離れた正常上皮には認められず、これらの事はp16の不活化が、正常に見えかつ部分的にメチル化した粘膜からdysplasiaや早期食道扁平上皮癌への変化の過程で生じていて、それはmonoallelicもしくは稀なメチル化が、biallelicもしくは全体的なメチル化へと変化していくためと考えられた。これはmodified Knudsonのtwohitモデルで説明できるであろう。p16のメチル化を認めずLOHのみを認めた食道扁平上皮癌では、おそらくはLOHに続きmutationやmicrodeletionがもう一方のalleleに生じp16の不活化を起こしたと考えられた。

#### 【結 論】

これらの結果はメチル化もしくはLOHそしておそらくはmutationを通してp16の不活化が起こっていて、個々の症例では、食道扁平上皮癌やdysplasiaが生じる以前にどの経路によりp16の不活化が起るのかが決定されていると考えられた。p16発現とHDのマッピングからはHDが、p16の不活化より後期のできごとと考えられた。

### 学位論文審査の結果の要旨

食道癌は、再発を含めた根治性の悪い疾患でありその発癌、進展の詳細については未だ不明である。近年多くの癌で癌抑制遺伝子であるp16が着目され、その不活化が発癌に関与していると報告されている。本研究では、食道癌摘出症例の全割ブロックを用いて、p16の不活化が実際どのように起こっているかを調べ発癌の様式を明らかにした。食道癌における発癌にはメチル化パターンと

LOH パターンの2種類があり、メチル化パターンによるものが大半を占め、発癌様式については、個々の症例毎に決定されていると考えられた。またメチル化パターンの癌部周囲にはp16の不活化を伴わないヘミメチル化した正常上皮が存在し、正常上皮にはすでに発癌へのfirst stepである遺伝子変化が起こっていると考えられた。食道癌の進展においては、さらなる遺伝子変化 (LOHやHD) が認められた。

本研究は発癌でのメチル化の関与を示すとともに食道全体を発癌の場としてとらえる必要性を示したもので、博士 (医学) の学位論文として価値のあるものと認められる。